



Formation ECOBIO
Novembre 2008
Madagascar

DOSAGES DE DIFFERENTS CONSTITUANTS DE LA PLANTE ET DE MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE STRESS



CLEMENT-VIDAL Anne
CIRAD/BIOS/UPR 104-AIVA
E-mail : anne.clement-vidal@cirad.fr

SOMMAIRE :

PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS	p2
SECHAGE DES ECHANTILLONS	p3
BROYAGE DES ECHANTILLONS	p4
MESURE DE LA TENEUR EN EAU ET DE LA TENEUR RELATIVE EN EAU (RWC)	p5
MESURE DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE	p8
DOSAGE DE LA PROLINE	p10
DOSAGE DES SUCRES NON STRUCTURAUX :	p13
Dosage des sucres solubles totaux	p15
Dosage du glucose, du fructose et du saccharose	p17
Dosage de l'amidon	p22
PRODUCTION D'ESPECES TOXIQUES DE L'OXYGENE	p23
DOSAGE DE MOLECULES ANTIOXYDANTES	p24
Dosage de l'acide ascorbique	p24
Dosage des thiols	p25
DOSAGE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES DETOXIFIANTES	p27
Dosage de l'activité guaiacol peroxydase	p28
Dosage de l'activité ascorbate peroxydase	p30
Dosage de l'activité catalase	p32
DOSAGES DES PROTEINES	p34
ANNEXES :	
Principe de la spectroscopie UV-Visible	p36
Éléments de cinétique enzymatique	p38

PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

La pertinence d'un résultat tient non seulement de la procédure analytique mais également des phases préliminaires qui commencent dès le prélèvement.

Il est essentiel de standardiser l'ordre, l'heure et les conditions de collecte des différents échantillons de façon à ce que ces différents paramètres soient comparables pour chaque échantillon de même nature et que leur incidence sur les résultats expérimentaux soit statistiquement insignifiante.

Le prélèvement d'un échantillon s'accompagne d'une phase de stress et occasionne la libération de certaines enzymes et d'hormones à proximité de la blessure qui va entraîner des réactions biochimiques dont l'incidence est inversement proportionnelle à la masse de l'échantillon. Il faut donc arrêter rapidement ce phénomène en refroidissant si possible le végétal prélevé. L'immersion dans l'azote liquide est la solution la plus performante. La congélation de tous les tissus même les plus internes du végétal est instantanée. Elle provoque en outre un éclatement cellulaire qui favorise le séchage et ultérieurement l'homogénéité du broyat. A contrario il faut craindre une dégradation rapide s'il y a ensuite décongélation. En absence d'azote liquide, la neige carbonique peut être utilisée avec un pouvoir refroidissant plus lent. La glacière réfrigérée est encore préférable à la conservation à température ambiante mais dans ce cas la procédure doit être rapide.

La taille de l'échantillon doit être compatible avec le processus analytique et être représentatif du phénomène étudié (organe, plante...). Par ailleurs dans certains cas le prélèvement demande un nettoyage minutieux préalable à l'eau distillée pour éliminer toutes traces d'éléments susceptibles d'interférer avec l'analyse (terre, insectes, élément minéraux...) sans pour autant induire la fuite des substances à analyser.

SECHAGE DES ECHANTILLONS

Le séchage peut être utilisé pour connaître la teneur en matières sèches de l'échantillon mais il permet surtout de bloquer le métabolisme cellulaire et ainsi d'améliorer la conservation des échantillons d'une part et de faciliter le broyage puis la réalisation des analyses.

Dans le cas d'analyses minérales, le séchage est réalisé par passage à l'étuve ventilée à $70\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures. L'étalement des échantillons facilite le séchage et permet d'avoir une température homogène.

Dans le cas des analyses biochimiques, le maintien de l'intégrité de l'échantillon demande de prendre de nombreuses précautions et impose la lyophilisation comme technique de séchage la plus adaptée. En effet l'utilisation de l'étuve entraîne l'apparition de dégradations de plusieurs types. Tout d'abord si l'échantillon a été conservé congelé le séchage à l'étuve va commencer par une phase de décongélation et une reprise potentielle de l'activité métabolique néfaste pouvant causer la perte significative de certaines substances (sucres, acides aminés...). Par ailleurs une élévation trop importante de la température peut aboutir à la transformation de certains composés comme lors de la caramélisation (sucres) ou de la réaction de Maillard (sucres, protéines). Si cependant l'étuve est la seule méthode possible il est recommandé dans ce cas de ne pas congeler les échantillons et de les sécher à $65-70^{\circ}\text{C}$ pendant 24 à 72 heures suivant la nature des échantillons (feuilles, graines, parties ligneuses...). L'utilisation d'une étuve sous vide est recommandée.

La lyophilisation est basée sur la propriété de l'eau de passer à basse température et faible pression de l'état solide à l'état gazeux (sublimation) ce qui évitent les problèmes énumérés précédemment. La durée nécessaire au séchage est variable selon les organes considérés et leur taille, elle est généralement supérieure à celle de l'étuve (48 à 96 heures dans la majorité des cas).

BROYAGE DES ECHANTILLONS

Cette étape fastidieuse est cependant de première importance. Sans être dénaturante elle doit conduire à l'élaboration d'une poudre végétale homogène suffisamment fine dont dépend la précision des analyses. Le broyage est généralement moins poussé dans le cas d'analyses minérales mais doit aboutir à une poudre de porosité inférieure à 100 μm pour des analyses biochimiques. L'emploi de plusieurs broyeurs peut s'avérer nécessaire avec parfois un pré-broyage plus grossier de gros échantillons qui seront ensuite broyés plus finement. Il est réalisé généralement à l'aide de deux types de broyeurs : broyeurs à couteaux ou à billes. Pendant le broyage l'échantillon doit conserver ses caractéristiques chimiques que ce soit par perte de composés ou enrichissement par contamination. Le principal risque concerne la caramélisation par échauffement de la poudre du aux forces de frottement. Il est lié à la durée du broyage et à la réfrigération appliquée. La neige carbonique ou l'azote liquide peuvent être utilisés pendant cette étape.

Broyeur à billes



Broyeur à couteaux



Broyeur centrifuge



MESURE DE LA TENEUR EN EAU ET DE LA TENEUR RELATIVE EN EAU (TRE ou RWC)

Contexte :

L'eau est la composante principale des plantes vertes : de 70 à 90 % pour la plupart des espèces non ligneuses et près de 50 % pour les espèces ligneuses. Cette eau se trouve essentiellement dans les cellules où elle constitue un milieu favorable à de nombreuses réactions biochimiques. Elle peut aussi agir comme substrat dans certaines réactions. C'est un excellent solvant pour le transport des éléments nutritifs et des assimilats via le xylème et le phloème vers les feuilles et les racines. Une autre fonction de l'eau est le maintien de la turgescence qui est essentiel pour le développement, la croissance de la cellule et pour maintenir la forme herbacée. La turgescence est aussi essentielle pour la régulation de la fermeture des stomates et le mouvement des feuilles.

Teneur en eau :

La mesure de la teneur en eau d'une plante va traduire la quantité d'eau directement présente dans les tissus et va permettre de suivre l'intensité du stress subi par la plante en cas de carence en eau.

TE (%) : rapport de la masse d'eau contenue dans l'échantillon sur la masse sèche de l'échantillon :
$$\frac{(MF-MS)*100}{MS}$$

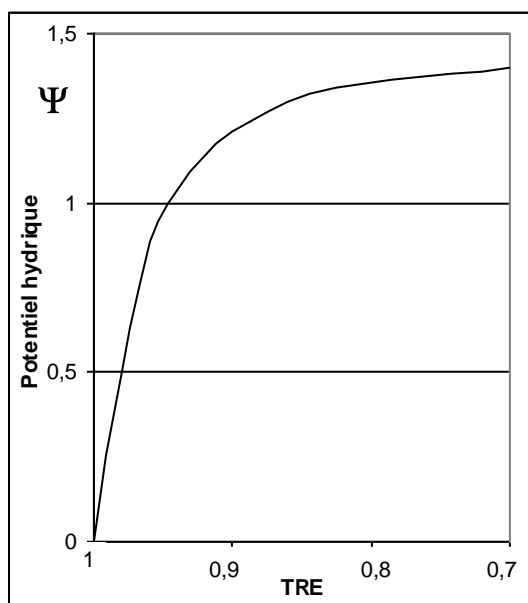
Elle peut être également exprimée par rapport à la matière fraîche de l'échantillon :
$$(MF-MS)*100/MF$$

MF : masse de l'échantillon après récolte avant passage à l'étuve.

MS : masse de l'échantillon après passage à l'étuve 24 h à 85°C.

Teneur relative en eau

L'évaluation de la teneur relative en eau rend compte non seulement des variations de la quantité d'eau présente dans les tissus mais également des modifications de leur capacité à incorporer de l'eau pendant la phase expérimentale de saturation des tissus. Il existe une relation entre la teneur relative en eau et le potentiel hydrique, cette relation varie en fonction de la nature et de l'âge du matériel végétal.



TRE (%) : rapport de la masse d'eau contenue dans l'échantillon après récolte sur la masse d'eau contenue dans l'échantillon à pleine turgescence :

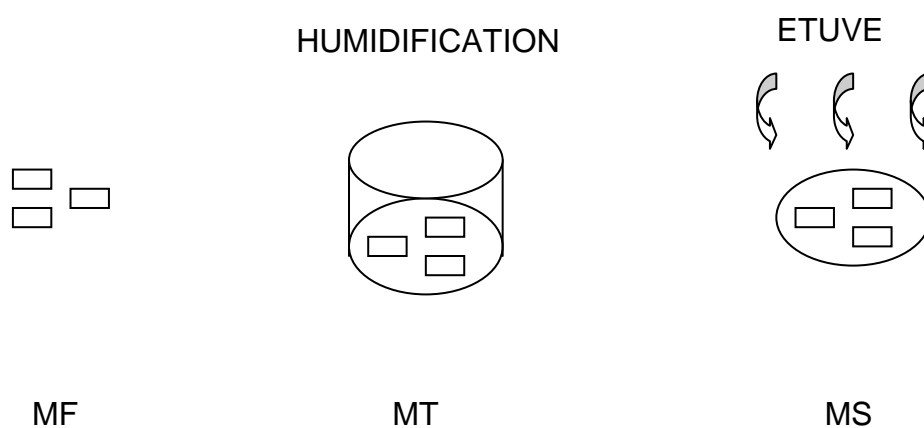
$$\frac{(MF-MS)*100}{(MT-MS)}$$

MT : masse de l'échantillon à pleine turgescence (saturation).

Méthodologie

Des disques d'environ 0.5 à 1 cm de diamètre sont réalisés dans la feuille fraîche lavée à l'eau distillée, à l'aide d'un emporte pièce. Ils sont pesés (MF) et déposés ensuite dans une boîte de pétri dont le fond est tapissé de papier filtre humidifié ou encore dans des piluliers remplis d'eau distillée. L'ensemble est mis

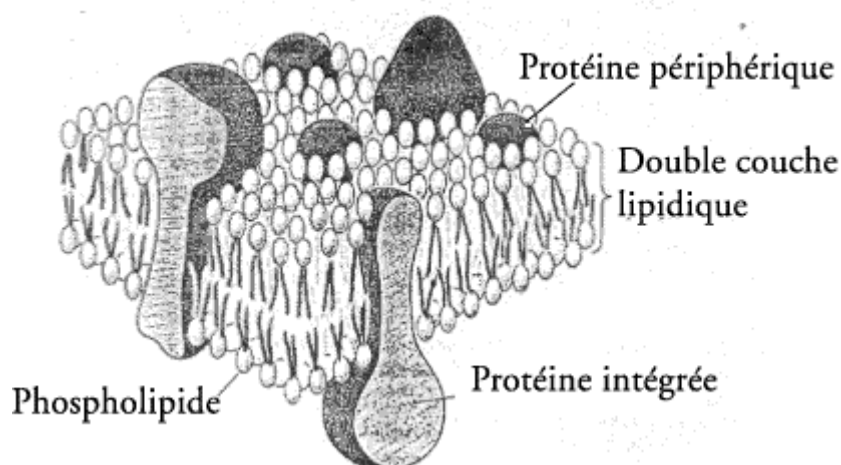
à 4°C, à l'obscurité pendant 15 heures. Après avoir légèrement épongé l'échantillon entre deux feuilles de papier absorbant il est pesé, sa masse est dite à saturation : MT. Enfin l'échantillon est placé dans une étuve à 85°C pendant 24 à 48 h. Il est pesé et sa masse sèche est enregistrée : MS.



MESURE DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE

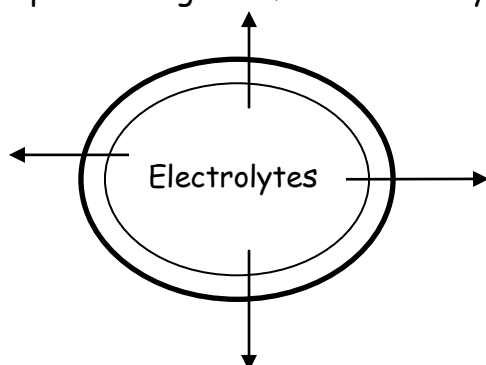
Contexte :

Les membranes cellulaires végétales jouent un rôle vital dans le fonctionnement de la cellule, elles sont constituées d'une bi-couche lipidique avec des protéines intrinsèques ou extrinsèques.



En cas de stress ces membranes vont subir des dénaturations qui vont altérer leur intégrité. Ces altérations sont dues à la peroxydation des lipides constitutifs et à la dénaturation des protéines membranaires. Une méthode pour évaluer l'intégrité des membranes au cours d'un stress consiste à mesurer la perméabilité membranaire aux électrolytes intra cellulaires. En effet un tissu immergé dans de l'eau distillée verra le contenu de ses cellules aller vers le milieu hypotonique ceci d'autant plus que ses membranes cellulaires seront altérées. La mesure de la conductivité du milieu aqueux après fuite des électrolytes, comparée à celle du milieu après libération de l'ensemble du contenu cellulaire, permet d'évaluer le pourcentage de fuite électrolytique, marqueur de la fragilité membranaire.

Conductivité 1 :





Méthodologie

Il s'agit de prélever 5 disques dans une feuille grâce à un emporte pièce et de les rincer dans une boîte de pétri contenant de l'eau distillée. Les disques sont alors placés dans un bêcher ou un tube contenant 10 ml d'eau distillée. L'ensemble est immergé dans un bain marie à 45°C pendant 2 à 3 heures. La conductivité de la solution est alors mesurée avec un conductimètre préalablement étalonné : C1.

L'échantillon est mis ensuite au bain marie bouillant pendant 20 minutes puis refroidi à la température ambiante. La conductivité est mesurée une seconde fois : C2.

Calcul

Le pourcentage de fuite d'électrolyte est calculé suivant la formule :

$$EC = \frac{C1 \cdot 100}{C2}$$

Références bibliographiques :

Bin Yan, Qiujie Dai, Xiaozhong Liu, 1996. Flooding induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil* 179, 261-268.

Qiujie Dai, Bin Yan, Shaobai Huang, 1997. Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV B radiation. *Physiologia Plantarum* 101, 301-308.

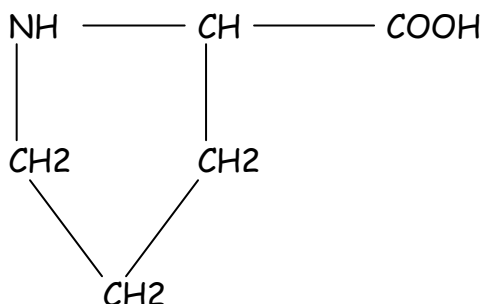
DOSAGE DE LA PROLINE

Contexte et objectifs :

De nombreuses plantes accumulent différents solutés en réponse à un stress salin ou hydrique. En effet lorsque le potentiel hydrique du sol diminue la réponse de la plante au niveau cellulaire est entre autre une accumulation de solutés dans le cytoplasme entraînant une diminution du potentiel hydrique intracellulaire et donc permettant à la plante d'absorber l'eau contenue dans le sol. Ce phénomène est appelé ajustement osmotique. Ces solutés sont non toxiques pour la cellule et n'inhibent pas les réactions enzymatiques même à forte concentration. Ils sont également dits osmoprotectants car ils ont un rôle de protection au niveau des protéines, des complexes protéiques et des membranes.

La proline fait partie de cette catégorie de composés et son accumulation dans les feuilles, les tiges et les racines est considérée comme une des réponses induites les plus répandues en cas de stress, ce qui en fait un excellent détecteur de stress. L'accumulation de la proline dépend du type et de l'intensité du stress. Elle se rencontre surtout en cas de stress hydrique ou osmotique mais aussi lié à la température. Sa détermination va permettre de détecter le stress, de le suivre dans le temps et de comparer son intensité. Par ailleurs il semble que l'accumulation de proline soit un paramètre transmissible génétiquement et donc il peut être utilisé pour la sélection de variétés tolérantes aux stress hydrique ou osmotique.

Molécule de proline :



Principe :

La ninhydrine ou hydrate de tricéto-hydrindène réagit avec les acides aminés en donnant un chromophore acides aminés-ninhydrine. Cependant pour la proline la fonction imine fournit une teinte rouge rosé qui présente un maximum d'absorption à 520 nm (méthode de Bates, 1973). Le chromophore proline-ninhydrine est préalablement extrait par du toluène. La quantité de proline présente est conforme à la loi de Beer-Lambert (cf. annexes).

Méthodologie

Extraction des échantillons :

Environ 0.5g de feuille est pesé avec précision et homogénéisé dans 10 ml d'acide sulfosalicylique 3 % (p/v) puis l'extrait est filtré sur papier filtre Whatmann.

Préparation de la gamme étalon :

Préparer une solution de proline à 2.5 mM dans de l'eau (0.287g/l).

Proline 2.5 mM (μ l)	0	20	40	60	80	100
A. sulfo. 3% (μ l)	1000	980	960	940	920	900
Proline (μ g)	0	5.77	11.55	17.32	23.1	28.85
Proline (nM)	0	50	100	150	200	250

Suivant la quantité de proline présente dans les échantillons, la courbe d'étalonnage pourra être complétée par des points supplémentaires dans les faibles valeurs.

Préparation du réactif ninhydrine :

Dissoudre 1.25 g de ninhydrine dans 30 ml d'acide acétique glacial et 20 ml d'acide phosphorique 6 M en chauffant légèrement sous agitation. Le réactif est conservé à 4°C à l'obscurité.

Dosage

1 ml de filtrat ou de gamme étalon réagit avec 1 ml de réactif ninhydrine et 1 ml d'acide acétique glacial. Laisser 1 heure à 100°C puis refroidir dans la glace. Le mélange est ensuite extrait en ajoutant 2 ml de toluène et en mélangeant pendant 15 à 20 secondes.

La phase toluénique est prélevée et son absorbance est lue à 520 nm en utilisant le toluène comme référence.

La quantité de proline est calculée par :

$$Q \text{ proline mg/gMF} = A \cdot V / MF \cdot K \text{ ou } Q \text{ proline mg/gMS} = A \cdot V / MS \cdot K$$

A : absorbance de l'échantillon

V : volume du filtrat en ml

K : pente de la gamme étalon $A=f(\mu\text{g proline})$

MF : masse de matière fraîche en mg

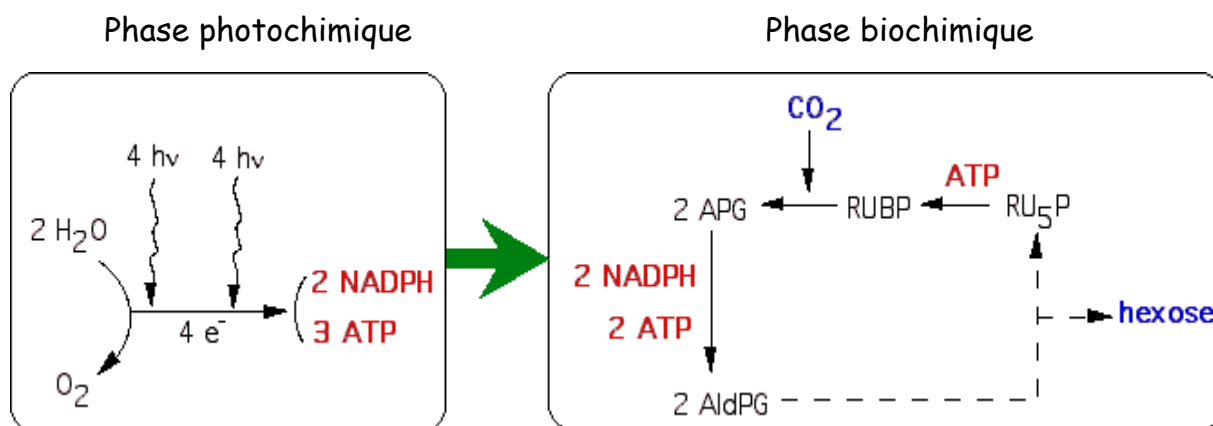
MS : masse de matière sèche en mg (avec $MS = MF / (1 + TE)$)

Référence : L. S. Bates, 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39, 205-207.

DOSAGE DES SUCRES NON STRUCTURAUX

Contexte :

Le carbone est absorbé au niveau des feuilles lors de la photosynthèse. Celle-ci comporte une phase photochimique réalisée dans les membranes des thylacoïdes et une phase biochimique représentée par le cycle de Calvin dans le stroma qui va permettre la formation d'assimilats.



La réalisation de bilans nutritionnels, l'étude des mécanismes de régulation du transport et de l'allocation des assimilats carbonés ou encore de la gestion des réserves glucidiques nécessitent le dosage des sucres non structuraux. Ils se répartissent en deux groupes, les sucres solubles et les sucres de réserves.

Les sucres solubles constituent une source glucidique rapidement métabolisable et vont assurer les besoins immédiats de la plante. Ce sont des intermédiaires métaboliques qui peuvent avoir une fonction de transport comme le saccharose, de stockage, de cryoprotecteur des membranes et des protéines cellulaires ou encore être impliqués dans l'ajustement osmotique.

Les sucres de réserve ne sont pas des sucres de structure comme la cellulose, ils ne sont pas non plus transportés, ni directement métabolisés. Ce sont des composés non indispensables à la constitution de la cellule vivante ni à sa survie immédiate mais intégrés dans un compartiment tampon, utilisés pour gérer les

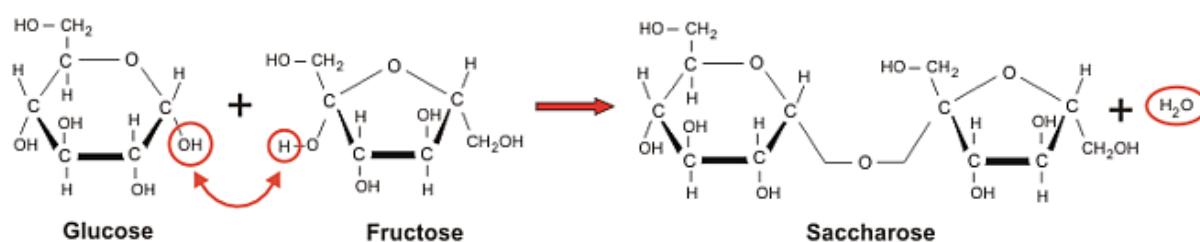
écarts entre quantités fournies et besoins immédiats des puits trophiques. Le sucre de réserve le plus répandu est l'amidon.

Structure des principaux sucres non structuraux :

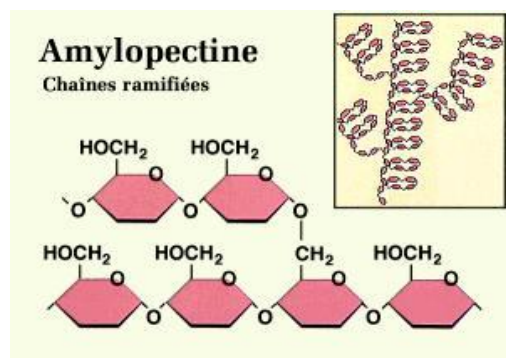
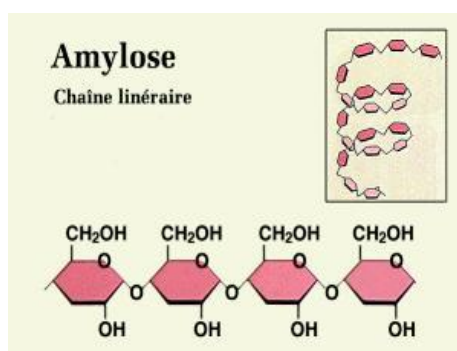
Monosaccharides : glucose, fructose

Disaccharides : saccharose

Polysaccharides : amidon



L'amidon est constitué de deux types de polymères de glucose : l'amylose et l'amylopectine :



DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES PAR LA METHODE A L'ANTHRONE

Principe : En présence d'acide concentré, les hexoses se déshydratent en dérivés furfurals qui réagissent avec l'anthrone après chauffage pour donner un composé coloré bleu vert qui absorbe à 627 nm. Les disaccharides dans ce milieu acide sont hydrolysés en hexoses.

Méthodologie

Réactif à l'anthrone :

290 ml d'eau bidistillée

710 ml d'acide sulfurique concentré

Ces deux composés sont mélangés au froid dans la glace.

Dissoudre 1 g d'anthrone. Conserver le réactif au froid (4°C) et à l'obscurité.

Préparer une solution de glucose 4 mM (720.6 mg/l) dans le milieu d'extraction des échantillons ou dans de l'eau.

Glucose 4mM (μl)	0	12.5	25	37.5	50	75	100
H ₂ O μl	100	87.5	75	62.5	50	25	0
Glucose mM	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Glucose μg/100μl	0	9	18	27	36	54	72

Echantillons : diluer l'échantillon 4 fois (50 μl d'échantillon pour 150 μl d'eau) puis prélever 100 μl. La dilution est à définir suivant la quantité de matière extraite au départ. Le dosage peut se faire soit après une extraction réalisée comme pour

le dosage des sucres par voie enzymatique (cf. p17) ou bien comme lors du dosage de la proline.

Ajouter 3 ml de réactif à l'anthrone. Laisser 10 minutes à 90 °C, refroidir dans de la glace 5 minutes. Lire l'absorbance à 627 nm.

La courbe d'étalonnage est ensuite tracée, elle suit la loi de Beer-Lambert (cf annexes) :

$$A = EIC$$

A : absorbance

E : coefficient d'extinction moléculaire

C : concentration

La pente de la droite permet de calculer la quantité d'hexose contenue dans l'échantillon extrait et donc d'exprimer les résultats par gramme de matière fraîche ou sèche.

$$Q \text{ mg/g MF} = (d \cdot A \cdot V \cdot 10) / (K \cdot \text{MF})$$

$$Q \text{ mg/g MS} = (d \cdot A \cdot V \cdot 10) / (K \cdot \text{MS})$$

d : dilution de l'échantillon

A : absorbance

V : volume total de l'extrait en ml

K : pente de la courbe d'étalonnage absorbance = f(μg glucose).

MF : masse de matière fraîche en mg.

MS : masse de matière sèche en mg (MS = MF / (1 + TE))

Référence bibliographique : Aschwell G., 1957. Colorimetric analysis of sugar. Methods Enzymol., 3, 73-105. Plant and Soil,

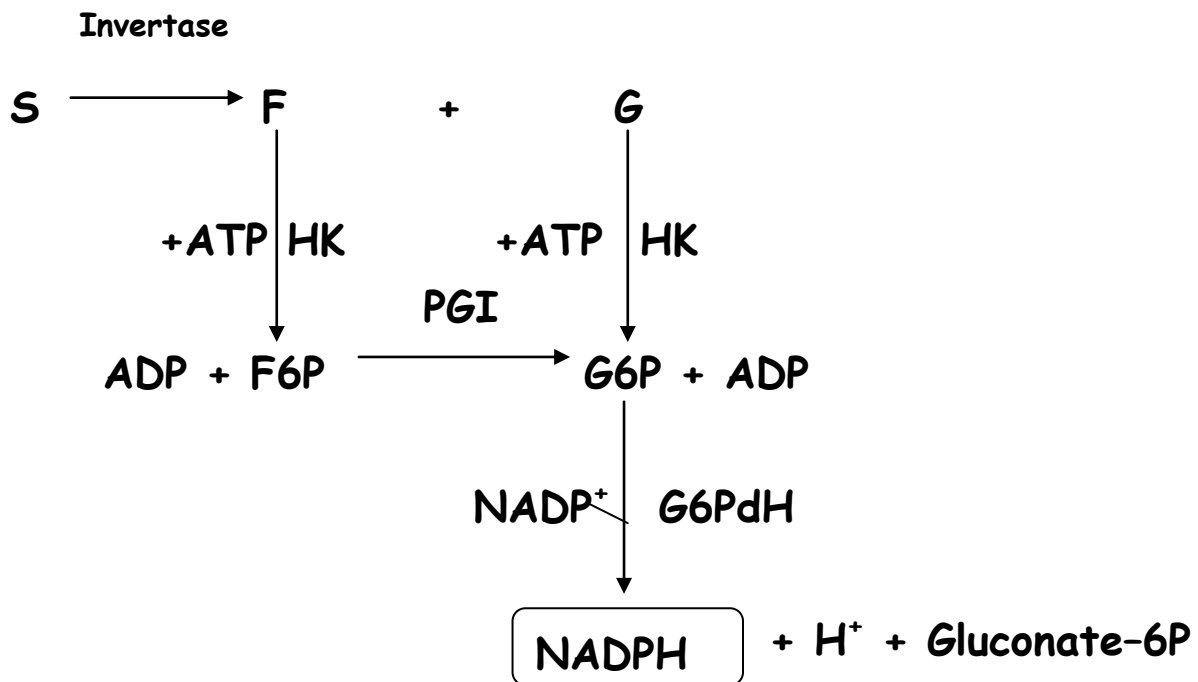
DOSAGE GLUCOSE, FRUCTOSE, SACCHAROSE ET AMIDON PAR METHODES ENZYMATIQUES INDIRECTES

Extraction

Le matériel doit être préalablement lyophilisé et broyé. La poudre est séchée 2 heures à 65°C. La prise d'essais est de 10-30 mg ou plus dans le cas d'échantillons hétérogènes, elle se fait dans des tubes type Eppendorf. 1 ml d'éthanol (ETOH) 80 % (v/v) est ajouté et passage au bain marie 80 °C 30 minutes. L'ETOH est récupéré après centrifugation et le culot est remis en contact d'1 ml d'ETOH 80 % à 80°C, 30 minutes. Après centrifugation et récupération d'ETOH le culot est repris dans 1 ml ETOH 50 % 80 °C 30 minutes. Après une dernière centrifugation les surnageants réunis contiennent les sucres solubles et le culot l'amidon. Le culot est additionné de 0.5 ml d'éthanol 80 % et mis au congélateur.

Le surnageant est ensuite filtré sur mini colonne contenant du polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et du charbon actif. La colonne est lavée par 2 fois 0.5 ml d'éthanol 80 %. Les filtrats sont évaporés à l'évaporateur rotatif ou au speedvac (évaporateur sous vide). L'échantillon est repris ensuite par 1 ml d'eau Ultra pure. Les dosages des sucres solubles sont ensuite réalisés.

Principe du dosage:



S : Saccharose

G : glucose

F : fructose

NADP(H) : nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (réduit)

HK : hexokinase

PGI : phosphoglucose isomérase

G6PdH : glucose 6 phosphate deshydrogénase

Il s'agit d'un dosage spectrophotométrique à 340 nm. La quantité de glucose initialement présente dans la cuve est proportionnelle au NADPH formé après addition des enzymes hexokinase et glucose 6 phosphate deshydrogénase. La synthèse du NADPH est suivie à 340 nm longueur d'onde à laquelle il absorbe contrairement au NADP. La loi de Beer Lambert $A = \epsilon l c$ qui lie absorbance et concentration à une longueur d'onde donnée permettra de quantifier le glucose présent dans la cuve ($E_{340, \text{NADPH}} = 6.22 \text{ L.mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

Dans la même cuve, en rajoutant de la phosphoglucose isomérase le F6P formé à partir du fructose présent initialement, est transformé en G6P qui est dosé comme précédemment. Ainsi la teneur en fructose sera quantifiée.

Enfin le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase dans une cuve à part et le glucose résiduel est dosé comme précédemment cependant le glucose initialement présent devra être soustrait.

Préparation des solutions et dosage

Tampon triéthanolamine TEA/HCl 0.75M pH 7.6 : 14g de TEA + 0.25g de $MgSO_4$, 7 H₂O qsp 100 ml avec de l'eau distillée. Ajuster avec NaOH 5N

NADP : 5 mg/ml (6.35 mM)

ATP : 25 mg d'ATP et 25 mg de $NaHCO_3$ /ml, attention au dégazage .

Glucose, fructose : solution mère à 4g/l pour faire des solutions à 0.1, 0.2, 0.3 et 0.4 g/l. Saccharose : solution mère à 8g/l pour faire des solutions à 0.2, 0.4, 0.6 et 0.8 g/l.

Solution mère μ l	25	50	75	100
ED μ l	975	950	925	900
GLU ou FRU g/l	0.1	0.2	0.3	0.4
SAC g/l	0.2	0.4	0.6	0.8

Par cuve ajouter :	250 μ l Tampon TEA	
	420 μ l ED	} 770 μ l
	50 μ l ATP 2.73 mM	
	50 μ l NADP 0.382 mM	
	50 μ l échantillon ou solution étalon	

Mesure de DO1 à 340 nm.

Ajout de G6PdH/HK 5 μ L correspondant à 1.7U et 0.85 U respectivement.

Attendre 10 mn et lire DO2

Pour le dosage du fructose ajouter 2 μ l de PGI 1.16 U.

Attendre 10 minutes DO3

Dans le cas du saccharose déposer 50 μ l d'échantillon ou d'étalon dans une cuve spectrophotométrique, ajouter 20 μ l d'invertase (préparée dans tampon citrate 0.32M pH 4.6 (0.16M acide citrique + 0.16 M citrate de sodium, ajuster avec NaOH 5 N) 5mg d'enzyme /1 ml de tampon). Laisser à l'étuve 30°C 30 minutes. Procéder ensuite comme pour le dosage du glucose.

Calcul

Un blanc est réalisé contenant tous les réactifs et 50 μ l d'ED,

Concentration en glucose de la solution d'échantillon :

Une première méthode consiste à utiliser la courbe d'étalonnage, la deuxième à utiliser directement le coefficient d'extinction moléculaire comme suit:

$$C \text{ glucose mM/l} = \frac{(DO2-DO1) \times Vc}{E_{340.} \times Vch}$$

Vc : volume total de la cuve : 820 μ l

Vch : volume de l'échantillon : 50 μ l

E_{340.} : coefficient d'extinction moléculaire du NADPH : 6.22

$$C_{\text{glucose mg/l}} = C \text{ glucose mM/l} \times 180.2$$

$$\text{Donc en fait } C \text{ glucose mg/l} = 475.12 \times (DO2-DO1)$$

$$\text{Et } C_{\text{glucose mg/g MS}} = \frac{C \text{ glucose (mg/l)} \times Vr(\text{ml})}{M(\text{mg})}$$

Vr : volume de reprise de l'échantillon : 1 ml

M : masse de l'échantillon

$$C \text{ fructose mM/l} = \frac{(DO3-DO2-) \times Vc}{E_{340.} \times Vch}$$

$$C_{\text{fructose}} \text{ mg/l} = C_{\text{fructose}} \text{ mM/l} \times 180.2$$

$$C_{\text{fructose}} \text{ mg/l} = 475.12 \times (\text{DO}_3 - \text{DO}_2)$$

$$C_{\text{fructose}} \text{ mg/g MS} = \frac{C_{\text{fructose}} \text{ (mg/l)} \times V_r}{M \text{ (mg)}}$$

Pour le saccharose le calcul est le même que pour le glucose on obtient en fait

$$C_{\text{glucose après hydrolyse}} \text{ mM/l} = C_{\text{glucose}} \text{ mM/l} + C_{\text{saccharose}} \text{ mM/l}$$

$$C_{\text{saccharose}} \text{ mM/l} = C_{\text{glucose après hydrolyse}} \text{ mM/l} - C_{\text{glucose}} \text{ mM/l}$$

$$C_{\text{saccharose}} \text{ mg/l} = C_{\text{saccharose}} \text{ mM/l} \times 342$$

$$C_{\text{saccharose}} \text{ mg/g MS} = \frac{C_{\text{saccharose}} \text{ (mg/l)} \times V_r}{M \text{ (mg)}}$$

DOSAGE DE L'AMIDON

Le culot précédent est décongelé (cf. extraction), le solvant de conservation est éliminé après centrifugation et le culot est séché 1 heure à 65°C ou au speedvac. La masse culot + tube est déterminée (P1). Le culot est repris dans 1 ml de soude 0.02 N, bien désagrégué est mis au bain marie 1 heure 30 à 90°C avec une agitation fréquente (ou autoclavage 2 heures 120°C, 1 bar). Après l'incubation les micro-tubes sont légèrement centrifugés (500 g, 1 minutes). L'hydrolyse de l'amidon est réalisée par adjonction de 100 µl d'amyloglucosidase dans chaque tube (amyloglucosidase : Fluka 10115, 70 U/mg, dilué dans tampon citrate 0.32 M pH 4.2 (0.16 M acide citrique + 0.16 M citrate de sodium, ajusté par soude 1 N si nécessaire) à 5 mg/ml) au bain marie à 50 °C pendant 1 heure 30, les tubes seront régulièrement agités. Les échantillons sont centrifugés et l'ensemble tube, culot et hydrolysats est pesé (P2).

Le dosage est ensuite réalisé dans les mêmes conditions que celui du glucose.

Calcul :

$$C_{\text{glucose}} \text{ mM/l} = \frac{(DO_2 - DO_1) \times V_c}{E_{340} \times V_{\text{ech}}}$$

V_c : volume total de la cuve : 820 µl

V_{ech} : volume de l'échantillon : 50 µl

E_{340} : Coefficient d'extinction moléculaire du NADPH

La concentration en amidon est exprimée en équivalent glucose.

$$C_{\text{glucose}} \text{ mg/l} = C_{\text{glucose}} \text{ mM/l} \times 180.2$$

$$C_{\text{glucose}} \text{ mg/gMS} = \frac{C_{\text{glucose}} \text{ (mg/l)} \times (P_2 - P_1)}{M \text{ (mg)}}$$

(P2-P1) : masse de solution de reprise de l'échantillon dont on estimera la densité à 1, donc on l'assimilera à un volume (environ 1.1 ml)

PRODUCTION D'ESPECES TOXIQUES DE L'OXYGENE

Contexte et objectif :

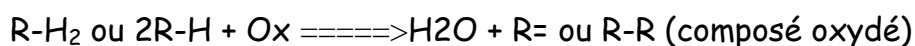
Le métabolisme cellulaire normal produit de faibles quantités d'espèces toxiques de l'oxygène (ROS) mais dans certaines situations cette production augmente fortement entraînant un stress oxydatif qui est défini comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. Ces formes toxiques de l'oxygène inclut les radicaux libres de l'oxygène : l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyl $\bullet OH$, l'oxygène singulet 1O_2 et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces composés sont produits par des phénomènes impliquant conjointement la présence de chaînes de transport des électrons et de l'oxygène. Dans la cellule végétale ils sont liés principalement aux processus de la photosynthèse, de la respiration et de la photorespiration mais ils peuvent être directement produit par certaines enzymes (oxydases).

Différents facteurs externes sont susceptibles d'induire la production de ROS notamment le déficit hydrique, les basses températures, les herbicides, les UV... La cellule va alors mettre en place des stratégies de défense par détoxification passive ou active. La détoxification passive va consister à produire des molécules antioxydantes : glutathion, acide ascorbique, tocophérol qui vont permettre la réduction des radicaux libres. La détoxification active est constituée des enzymes superoxyde dismutases et catalase, ainsi que des enzymes à activité peroxydasique, qui permettent la transformation de l'anion superoxyde et des peroxydes formés en excès en produits non toxiques.

DOSAGE DE MOLECULES ANTIOXYDANTES

Objectifs :

Un certain nombre de molécules sont capables de réagir chimiquement avec les formes toxiques de l'oxygène afin de les réduire. La réaction générale est la suivante :



Ces molécules se trouvent en faible concentration dans les tissus sauf généralement dans les organes photosynthétiques.

Préparation de l'extrait brut

Les feuilles congelées sont broyées dans un mortier en présence d'azote liquide puis dans 10ml d'acide sulfosalicylique 3 % contenant 0.1 % d'EDTA (acide éthylène diamine tetracétique) à 4°C. Le broyat est ensuite centrifugé 15 minutes à 4°C, à 11 000 g. Cette opération est répétée une deuxième fois sur une aliquote de 2 ml du surnageant obtenu. Cette double centrifugation a pour but d'éliminer les débris végétaux contenus dans le broyat.

Dosage de l'acide ascorbique

Principe :

La méthode d'Okamura (Okamura, 1980) est utilisée pour réaliser la quantification de l'acide ascorbique. Cette méthode colorimétrique est basée sur la réduction de l'ion ferrique par l'acide ascorbique en milieu acide et en présence de 2,2' dipyridyl. Le complexe ainsi formé absorbe à 525 nm et l'absorbance suit la loi de Beer-Lambert (cf annexes).

Préparation des réactifs :

Réactif A : tampon phosphate KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH=7.4, 0,15 M (10mL) + acide trichloracétique 10% (25mL), eau bidistillée (15mL), acide phosphorique au $\frac{1}{2}$

préparé dans de l'eau (20mL), 2,2' dipyridyl à 4% dissout dans de l'éthanol absolu (20mL)

Réactif B : chlorure de fer III (3%) dans de l'eau bidistillée

Une solution standard d'ASA 2 mM est préparée extemporanément et servira à effectuer la courbe d'étalonnage.

Préparation de la gamme étalon :

Ascorbate 2 mM μL	0	10	20	30	40	50
TCA 2,5 % μL	50	10	20	30	40	50

Dosage : 50 μL d'extrait préalablement préparé ou de gamme étalon sont mis en contact avec 1,8 mL de réactif. Puis 200 μL de réactif B sont ajoutés. Après 30 min la réaction est terminée et on peut donc procéder à la lecture de l'absorbance en spectrophotométrie à 525 nm.

Dosage des thiols

Principe : Les thiols réagissent avec l'acide 5,5' dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) pour former de l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque TNB qui se colore en jaune en milieu alcalin et absorbe à 412 nm (Ellman, 1959). Le chromophore ainsi créé suit la loi de Beer-Lambert. La quantification des thiols est effectuée en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée en présence de glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) réduit. La mesure en spectrophotométrie se fait assez rapidement car les groupements R-SH s'oxydent en peu de temps en milieu alcalin.

Préparation des réactifs :

Solution aqueuse de Tris à 0.5 M (250 mL)

Solution aqueuse de DTNB (DTNB 10 mM ; EDTA 20mM pour 25mL)

Solution d'acide sulfosalicylique 3%

Solution aqueuse de glutathion réduit à 1 mM (50mL)

Préparation de la gamme étalon :

Glutathion réduit 1mM μL	0	20	40	60	80	100
Acide sulfosalicylique μL	1000	980	960	940	920	900

Dosage : Un millilitre de solution étalon ou d'échantillon réagit avec 50 μL de DTNB, 1 mL de Tris 0.5M est alors ajouté. La lecture est effectuée dans les 30 minutes à 412 nm.

Références bibliographiques :

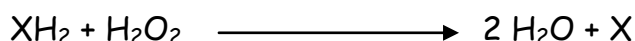
Okamura M (1980) An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. Clin. Chim. Acta **103**: 259-268

Ellman GL (1959) Tissue sulphydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. **82**: 70-77

DOSAGE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES DETOXIFIANTES

Objectifs :

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 bien que moins toxique que l'ion superoxyde diffuse beaucoup plus facilement dans les cellules et le rend particulièrement dangereux. Ainsi les peroxydases susceptibles de le transformer en eau en présence d'un composé réduit vont permettre de le détoxifier.



La mesure de l'activité (cf. annexe enzymologie) des peroxydases non spécifiques est réalisée en utilisant un substrat non physiologique le guaiacol alors que l'activité ascorbate peroxydase est évaluée en présence d'acide ascorbique composé présent dans la cellule végétale.

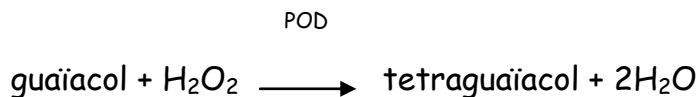
La catalase permet elle de détoxifier directement le peroxyde d'hydrogène sans la présence d'un autre substrat, cependant son affinité (cf. annexe enzymologie) pour lui est très faible et donc la détoxication ne peut se faire qu'à concentration en peroxyde élevé (plusieurs millimoles) contrairement aux peroxydases.

Préparation de l'extrait protéique

Les feuilles fraîches sont lavées à l'eau distillée et 500mg à 1g sont pesés précisément puis triturés dans un mortier à 4°C contenant 10 ml de tampon phosphate de potassium 0.1 M pH 7.0 contenant 0.1 mM d'EDTA, 0.1 mM d'ascorbate et 1% de polyvinylpolypirrolidone. L'extrait est ensuite centrifugé 15 minutes à 12000 g à 4°C. Les activités enzymatiques ainsi que les teneurs en protéines sont dosées sur cet extrait.

Dosage de l'activité guaiacol peroxydase

Principe



POD : guaiacol peroxydase : EC 1.11.1.7.

Le tetraguaiacol absorbe à 436 ou 470 nm contrairement au guaiacol. $E_{436} = 25.5 \text{ L.mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ou $E_{470} = 26.6 \text{ L.mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

La réaction est réalisée en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.0 contenant 0.25 mM de H_2O_2 5 mM de guaiacol.

Préparation des réactifs

Tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.0 : préparer une solution de KH_2PO_4 50 mM et une solution de K_2HPO_4 50 mM puis mélanger ces deux solutions jusqu'à atteindre le pH désiré.

Le guaiacol 5 mM est directement préparé dans le tampon phosphate soit 5.6 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$

H_2O_2 5 mM (30.8 % d=1.13, MM = 34.01) soit 5 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$. Si le perhydrit (H_2O_2 sous forme solide) est utilisé il faut dissoudre 1 comprimé dans 100 ml d'eau distillée et en utiliser 50 μl par ml de tampon dans la cuve.

Dosage de l'activité

Tampon phosphate de potassium	1 ml
Guaiacol 5 mM	
H_2O_2 (perhydrit) 5 mM	50 μl

La vitesse de la réaction est enregistrée après adjonction d'un volume v (μl) d'échantillon à 470 nm et la vitesse initiale V_i est mesurée en DO/mn.

Calcul :

Activité = $(V_i \cdot V) / (E_{470} \cdot v)$: μmoles de guaiacol transformées par minute et par ml d'extrait = U.I./ml

V : volume de la cuve en μl .

v : volume de l'échantillon en μl .

$E_{470} = 26.6 \text{ L.mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

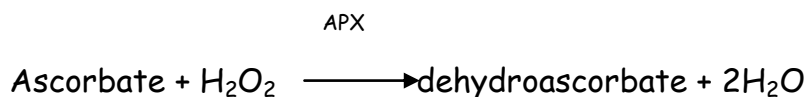
Le dosage de la teneur en protéines dans l'extrait permet d'exprimer ce résultat en activité spécifique en ramenant l'activité en U.I./ml par mg de protéines.

Références : Sanchez-Romero C., Garcia-Gomez L., 1995. One step purification of an avocado peroxidase. *Plant Physiol. Biochem*, 33,531-537.

Putter J., 1974. Peroxidases. In : *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer H. U. Eds, Academic Press, New York and London, 685-688.

Dosage de l'activité ascorbate peroxydase

Principe



APX : ascorbate peroxydase : EC 1.11.1.11

L'ascorbate absorbe à 290 nm contrairement au dehydroascorbate ($E_{290} = 2.8 \text{ L} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et donc sa transformation en dehydroascorbate en présence d'ascorbate peroxydase sera suivi par diminution de l'absorbance au cours du temps à cette longueur d'onde. La réaction est réalisée en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.0 contenant 0.25 mM de H_2O_2 et 0.5 mM d'acide ascorbique.

Préparation des réactifs :

Le tampon précédent est utilisé (tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.0) contenant H_2O_2 5 mM (30.8 % d=1.13, MM = 34.01) soit 5 μl /10 ml de tampon. Si le perhydrit (H_2O_2 sous forme solide) est utilisé il faut dissoudre 1 comprimé dans 100 ml d'eau distillée et en utiliser 50 μl /1 ml de tampon. Une solution d'acide ascorbique à 20 mM est préparée dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.0.

Dosage de l'activité

Tampon phosphate de potassium	1 ml
H_2O_2 (perhydrit) 5 mM	50 μl
Acide ascorbique (20mM)	25 μl
Echantillon	v μl

La vitesse de la réaction est enregistrée après adjonction d'un volume v d'échantillon, à 290 nm et la vitesse initiale V_i est mesurée en DO/mn.

Calcul

Activité = $(V_i \cdot V) / (E_{290} \cdot v)$: μ moles d'ascorbate transformées par minute et par ml d'extrait = U.I./ml

V : volume de la cuve en μ l.

$E_{290} = 2.8 \text{ L} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

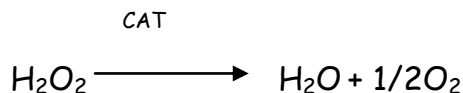
v : volume de l'échantillon en μ l.

Le dosage de la teneur en protéines dans l'extrait permet d'exprimer ce résultat en activité spécifique en ramenant l'activité en U.I./ml par mg de protéines.

Références : Nakano Y., Asada K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880.

Dosage de l'activité catalase

Principe



CAT : catalase : EC 1.11.1.6

Le peroxyde d'hydrogène absorbe à 240 nm ($E_{240} = 39.4 \text{ L.mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et donc sa transformation en présence de catalase sera suivi par diminution de l'absorbance au cours du temps à cette longueur d'onde. La réaction est réalisée en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.0 contenant 20 mM de H_2O_2

Préparation des réactifs :

Le tampon précédent est utilisé (tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.0).

H_2O_2 400 mM (30.8 % d=1.13, MM = 34.01) soit 400 μl /10 ml de tampon.

Dosage de l'activité

Tampon phosphate de potassium	1 ml
-------------------------------	------

H_2O_2 400mM	
------------------------------	--

Echantillon	v μl
-------------	-----------------

La vitesse de la réaction est enregistrée après adjonction d'un volume v d'échantillon à 240 nm et la vitesse initiale V_i est mesurée en DO/mn.

Calculs :

Activité = $(V_i \cdot V) / (E_{240} \cdot v)$: μmoles de guaiacol transformées par minute et par ml d'extrait = U.I./ml

V : volume de la cuve si ce n'est pas 1 ml.

$$E_{240} = 39.4 \text{ L} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}.$$

v : volume de l'échantillon en μl .

Le dosage de la teneur en protéines dans l'extrait permet d'exprimer ce résultat en activité spécifique en ramenant l'activité en U.I./ml par mg de protéines.

Références : Aebi H., 1974. Catalase, In : In : Methods of enzymatic analysis, Bergmeyer H. U. Eds, Academic Press, New York and London, 673-684.

DOSAGES DES PROTEINES

Objectif : Le dosage des protéines est utilisé surtout en enzymologie pour exprimer l'activité enzymatique par rapport à la quantité de protéines présentes dans l'extrait et pouvoir ainsi comparer l'activité présente dans différents extraits.

Principe : La liaison du colorant Coomassie Brilliant blue G-250 aux protéines implique un déplacement du pic d'absorption de 465 à 595 nm, ainsi l'absorption à 595 nm est enregistrée et suit la loi de Beer-Lambert en fonction de la quantité de protéines présente.

Méthodologie :

Préparation du réactif :

100 mg de Coomassie brilliant blue G 250 sont dilués dans 50 ml d'éthanol, 100 ml d'acide phosphorique 85 % sont ajoutés et de l'eau bidistillée est additionnée q.s.p 1000 ml. Le réactif est filtré sur papier filtre Whatman.

Gamme étalon :

Une solution de sérum albumine bovine à 0.5 mg /ml est préparée.

Alb. 0.5mg/ml (μ l)	0	10	15	20	25	30	40	50
Alb. μ g	0	5	7.5	10	12.5	15	20	25
Réactif (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1

Lecture de l'absorbance entre 5 et 60 minutes à 595 nm. La relation entre la concentration et l'absorbance suit la loi de Beer-lambert (cf. annexe spectroscopie)

v μ l de l'extrait dont on veut déterminer la concentration en protéines sont additionnés de 1 ml de réactif (diluer l'extrait si nécessaire). Lecture de l'absorbance .

Calcul

Concentration de l'extrait en protéine (μ g/ml) = $(A \cdot V \cdot d) / (K \cdot v)$

A : absorbance

V : volume de l'extrait en μ l

d : dilution

K : pente de la droite $A = f(\mu$ g protéines)

Référence : Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem., 72, 248-254.

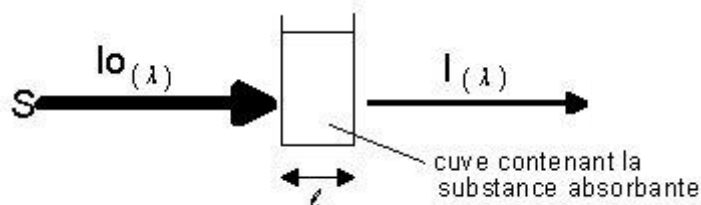
ANNEXES

Principe de la spectroscopie

Lorsqu'un faisceau de lumière blanche traverse une solution d'un chromophore ce dernier absorbe certaines longueurs d'onde. Le domaine de longueurs d'onde absorbées préférentiellement s'appelle la couleur complémentaire. Par exemple une solution qui apparaît bleue sous entend qu'elle absorbe principalement dans le jaune (614 nm). Le rayonnement lumineux incident va se décomposer en un rayonnement réfléchi, un rayonnement absorbé et un rayonnement transmis d'intensité respective I_0 , I_r , I_a et I avec $I_0 = I_r + I_a + I$

La spectrophotométrie s'intéresse particulièrement à la relation qui existe entre la rayonnement incident et le rayonnement transmis dans le cas de faisceau monochromatique.

Lorsqu'une lumière monochromatique d'intensité I_0 traverse un milieu homogène, l'intensité de la lumière émergente I décroît exponentiellement lorsque l'épaisseur et/ou la concentration du milieu absorbant augmentent.



La loi fondamentale utilisée en spectrophotométrie dite loi de Beer-Lambert permet de relier l'absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée avec sa concentration.

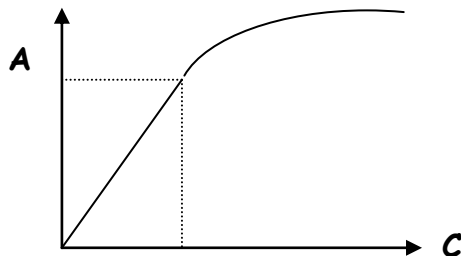
$$A = \log_{10} I_0/I = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

l : épaisseur de la cuve de mesure en centimètre = 1 cm

C : concentration de la solution absorbante exprimé en mole/l

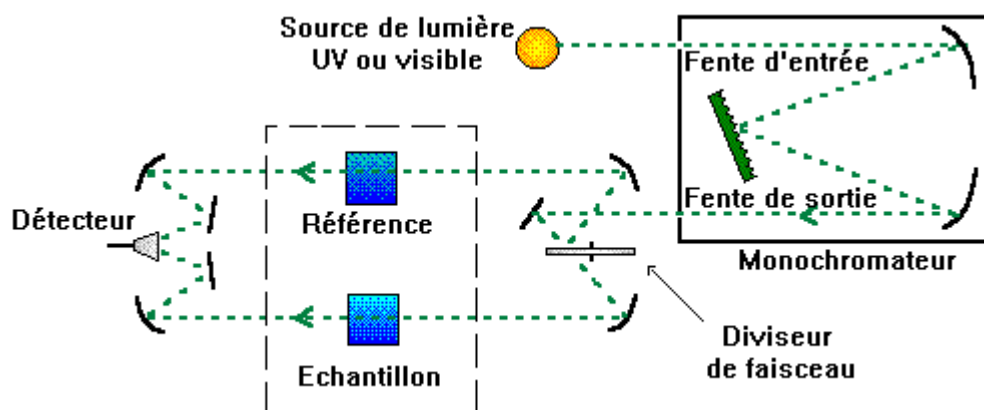
ε : coefficient d'extinction molaire

La réalisation préalable d'une gamme étalon reliant l'absorbance avec des concentrations connues de l'absorbant permet de connaître le domaine de linéarité et ensuite de pouvoir déterminer la concentration en absorbant d'une solution inconnue.



Spectrophotomètre UV-Visible :

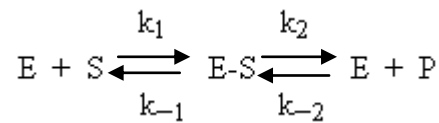
Il se compose d'une source lumineuse UV ou visible, d'un monochromateur permettant de sélectionner la longueur d'onde, d'un diviseur de faisceau qui alternativement envoie le rayonnement monochromatique vers une cuve référence (contient généralement le solvant sans absorbant) et une cuve contenant l'échantillon, enfin un détecteur qui mesurera l'absorbance.



Eléments de cinétique enzymatique

De nature protéique les enzymes sont des catalyseurs biologiques spécifiques de la réaction et du substrat. L'enzyme ne peut catalyser qu'une réaction thermodynamiquement possible, elle va essentiellement augmenter la vitesse de la réaction de transformation du substrat en produit.

La réaction enzymatique peut être décomposée en 2 étapes :



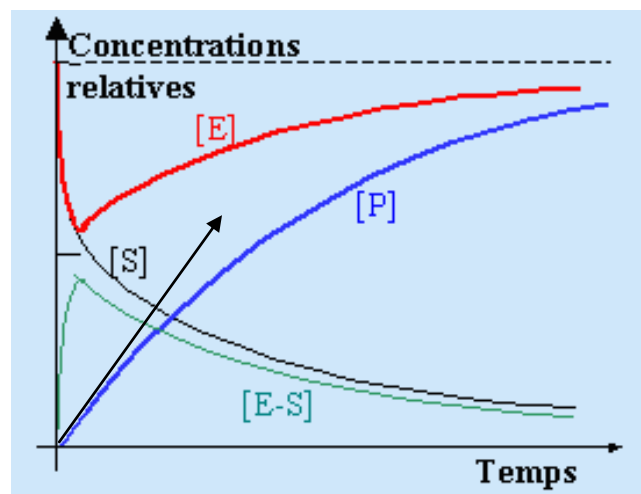
Dans ce système réactionnel, E, S, et P sont respectivement l'enzyme, le substrat et le produit et E-S un complexe enzyme - substrat.

k_2, k_{-1} : constantes de dissociation du complexe E-S

k_1, k_{-2} : constantes de formation du complexe E-S

Remarque : en début de réaction l'absence de produit fait que la réaction -2 est négligeable.

La concentration de ces différents composés va évoluer en fonction du temps de la façon suivante :



La vitesse initiale d'apparition du produit P, $V_o = dP/dt$ est donnée alors par l'équation de Michaelis :

$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

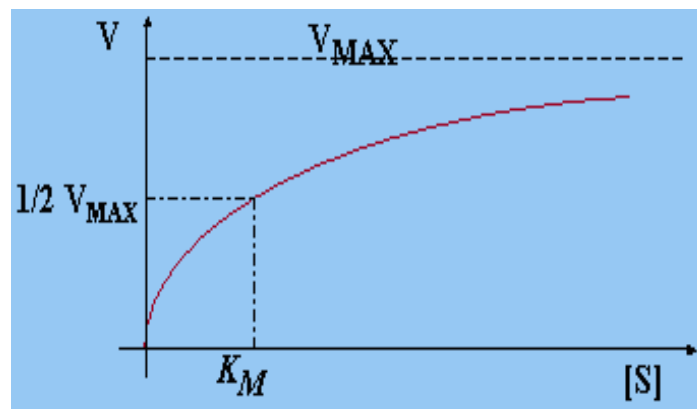
V_{\max} : vitesse maximale de la réaction

$[S]$: concentration en substrat

K_M : constante de Michaelis

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Ainsi la courbe représentative de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat est la suivante :



Mesure de l'activité enzymatique : Lors de la mesure d'une activité enzymatique il faudra donc utiliser une concentration en substrat saturante qui permette de mesurer la vitesse maximale V_{\max} . En général une concentration de l'ordre de 10 fois le K_M est utilisée.

Le K_M représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat, plus sa valeur est élevée moins l'enzyme a de l'affinité pour son substrat et plus il faudra une forte concentration en substrat pour atteindre la V_{\max} .

Les réactions enzymatiques sont sensibles à la température et au pH, paramètres qu'il faut maîtriser pendant les mesures (utilisation de cuves thermostatées et de solutions tampons).